

ÉRTEKEZÉSEK EMLÉKEZÉSEK

KLEMENT ZOLTÁN

BAKTERIÁLIS
PATOGENEZIS
A FOGÉKONY ÉS
BETEGSÉGELLENÁLLÓ
NÖVÉNYBEN



80

AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST



ÉRTEKEZÉSEK
EMLÉKEZÉSEK

ÉRTEKEZÉSEK EMLÉKEZÉSEK

SZERKESZTI
TOLNAI MÁRTON

KLEMENT ZOLTÁN

BAKTERIÁLIS
PATOGENEZIS
A FOGÉKONY ÉS
BETEGSÉGELLENÁLLÓ
NÖVÉNYBEN

AKADÉMIAI SZÉKFOGLALÓ

1986. FEBRUÁR 18.



AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST

A kiadványsorozatban a Magyar Tudományos Akadémia 1982. évi
CXLII. Közgyűlése időpontjától megválasztott rendes
és levelező tagok székfoglalói — önálló kötetben — látnak
napvilágot.

A sorozat indításáról az Akadémia főtitkárának 22/1/1982.
számú állásfoglalása rendelkezett.

ISBN 963 05 5733 9

Kiadja az Akadémiai Kiadó, Budapest

© Klement Zoltán, 1990

Minden jog fenntartva, beleértve a sokszorosítás,
a nyilvános előadás,
a rádió- és televízióadás, valamint a fordítás jogát,
az egyes fejezeteket illetően is.

A kiadásért felelős az Akadémiai Kiadó
és Nyomda Vállalat főigazgatója
A nyomdai munkálatokat az Akadémiai Kiadó
és Nyomda Vállalat végezte
Felelős vezető: Hazai György
Budapest, 1990
Nyomdai táskaszám: 19 011

Felelős szerkesztő: Kőmíves Veronika
Műszaki szerkesztő: Kiss Zsuzsa
Kiadványszám: 2751
Megjelent 1,77 (A/5) ív terjedelemben
HU ISSN 0236-6258

Printed in Hungary

BEVEZETÉS

Az emberiséget évszázadok óta foglalkoztatja a betegségellenállóság kérdése, ugyanis a növénytermesztési gyakorlatban jól ismernek olyan fajtákat, amelyek csak gyengén vagy egyáltalán nem betegszenek meg. Ezek az ún. rezisztens fajták ugyan jó alapanyagai a növénynemesítőknek, azonban a rezisztencia okát valóban nem ismerik. Hasonlóan nehezen tudunk válaszolni arra, hogy miben rejlik egy mikroorganizmus kórokozóképessége, patogenitása. Különösen komplexsé válik a kérdés, ha figyelembe vesszük azt is, hogy ugyanazon rezisztensnek vélt gazdanövény egy másik kórokozóval szemben nem ellenálló. Tovább komplikálódik a kérdés azzal is, hogy ugyanazon kórokozó különböző változatai (rasszai, biotípusai) ugyanazon növényfajt vagy nem, vagy különböző mértékben betegítene meg.

Intézetünkben az ötvenes és hatvanas években egy jól összeszokott, baráti kutatógárda alakult ki. Ennek a kis csoportnak minden egyes tagját szinte ugyanazon kérdés foglalkoztatta, nevezetesen: miért betegségellenálló a rezisztens növény, más szóval milyen biokémiai és fiziológiai mechanizmusok játszanak közre a rezisztencia kialakulásában?

Bár az alapkérdés mindnyájunk számára azonos volt, a feleletet azonban más-más gaz-

da—parazita kapcsolatban kerestük. Éppen ez volt a rendkívüli ebben a kóréletteni iskolában, hogy egyazon kutatóhelyen, a budapesti Növényvédelmi Kutatóintézetben, párhuzamosan végezhattuk kísérleteinket vírus-, baktérium- és gombabetegségek vonatkozásában. Mivel ilyen kutatócsoport más kutatóhelyen nem alakult ki, így abban az előnyben voltunk, hogy eredményeinket kölcsönösen megvitatva szintetizálhattuk az általános érvényű megállapításokat, vagy éppen a különbségeket tárhattuk fel. Ezért e helyen is köszönetet mondok Király Zoltán, Farkas Gábor, Solymossy Ferenc, Lovrekovich László és Vörös József kollégáknak és barátoknak azért a tudományos atmoszféráért, amelyben dolgozni mindig élvezet volt, és aminek hiányában talán most nem állnék ezen a helyen.

Nagy tisztelettel és szeretettel kell szólnom Husz Béla professzoromról és Ubrizsy Gábor akadémikusról, volt intézeti igazgatómról is, akik, még mint fiatal kutatóban megbíztak, és egy addig hazánkban nem művelt tudományterületet, a növények baktériumos betegségeinek kutatását bízták rám.

Előadásom összeállításakor úgy döntöttem, hogy munkásságomból csak egy szegmenetet mutatok be, és csak olyan kérdéseket tárgyalok, amelyek most is világszerte az érdeklődés homlokterében vannak. Három különálló, de mégis összefüggő témában mutatom be a növény és kórokozó baktériumok bonyolult köl-

csönhatását az ellenálló és fogékony gazda—parazita kapcsolatban.

Közismert, hogy a foltosodást és elhalást okozó baktériumok a levél nyitott légzőnyílásain vagy sebzéseken át jutnak a sejtközötti járatokba, ahol a sejtközötti folyadékban felszaporodva 5-6 nap múlva szövetelhalásokat okoznak. A használatos fertőzési módszerekkel a rezisztens vagy gazdaidegen növény legtöbbször tünetmentes marad, azonban mikroszkóp alatt a fertőzés helyénél mégis néhány elhalt növénysejtet látunk. Mivel az egészséges szövetben a néhány elhalt növénysejt vizsgálata lehetetlen volt, ezért olyan módszert kellett kidolgoznunk, aminek segítségével meghatározott mennyiségű baktériumot juttathattunk a sejtközötti járatokba, annyit, hogy minden növénysejt egy időben fertőződhessen legalább egy baktériumsejttel és így a patológiai folyamatok is egy időben játszódhassanak le. Erre az injekciós infiltrálási módszert találtuk ki, amit ma már a növénykórtani és növényélettani laboratóriumokban rutinszerűen világszerte használnak (Klement, 1963). Ha ezzel a módszerrel fertőzzük pl. a dohány leveleit, azt tapasztaljuk, hogy míg a fogékony (kompatibilis) kapcsolatban a baktérium jelentős mértékben felszaporodik és a tünetek csak lassan, 5-6 nap múlva fejlődnek ki, addig a rezisztens (inkompatibilis) kapcsolatban egy nagyon gyors, 7-10 óra alatt lejátszódó szövetelhalás (nekrozis) jelentkezik. Ezzel egy időben a kezdeti

baktériumszaporodás is megáll, és így a betegség lokalizálódik. Ha az injekciózást nem kórokozó (szaprofiton) baktériumokkal végeztük, akkor a növény tünetmentes maradt és baktériumszaporodás sem volt kimutatható (Klement, Farkas és Lovrekovich, 1964).

Az injekciós infiltrálási módszer segítségével először bizonyítottuk, hogy valamennyi fitopatogén *Pseudomonas* és *Xanthomonas* faj egy közös patológiai tulajdonsággal rendelkezik, nevezetesen azzal, hogy az inkompatibilis növényben gyors szövetelhalást, ún. hiperszenzitív reakciót (HR) indukál. Ezzel világossá vált, hogy a hiperszenzitivitás egy általános törvényszerűség a növényvilágban, amely a vírusos és a gombás betegségek esetében is megtalálható, de mindig csak akkor jelentkezik, ha inkompatibilis gazda—parazita kapcsolatról van szó. Ilyen inkompatibilis kapcsolat áll fenn például a rezisztens, betegséggellenálló növényben is. Mivel a rezisztencia kérdése alapvetően foglalkoztatta a fitopatológusokat és növénynemesítőket, és mivel a baktériumokkal módszertanilag könnyebb volt dolgozni, megfigyeléseink következtében világszerte új bakteriológiai laboratóriumok alakultak a hiperszenzitivitás kérdésének megismerésére.

A BETEGSÉG LEFOLYÁSA A REZISZTENS NÖVÉNYBEN

Már kísérleteink korai fázisában bebizonyosodott, hogy a rezisztens növények fertőzött sejtjeinek gyors elhalása (HR) nem a baktériumtoxinok vagy toxikus baktériummetabolitok következménye, hanem egy olyan autolitikus folyamat a növényi sejtben, amely folyamatot a kórokozó csak indukálja, és az a növényben irreverzibilis módon lezajlik. Ezt úgy lehetett bizonyítani, hogy a fertőzést követő 1,5-2 órában a baktériumok szaporodását antibiotikumokkal meggátoltuk, a HR ennek ellenére kialakult (Klement, 1971).

A rezisztens növény hyperszenzitív válasza a fertőzéssel szemben tulajdonképpen jól mérhető négy fázisra osztható (*1. táblázat*). Ezek: az indukciós idő, a tünetmentes latenciefázis, a sejt vagy szövet kollapszusa, végül az elhalt szövet kiszáradása és a kórokozó lokalizálása (Klement, 1982).

A patogenezis korai időszakában, vagyis az indukciós időben történik a baktériumsejt és a növénysejt kölcsönös felismerése, vagyis annak eldöntése, hogy a növény szenzitív vagy rezisztens reakcióval válaszoljon-e. Amennyiben inkompatibilis kapcsolat áll fenn, akkor rezisztens reakció, vagyis hyperszenzitív nekrosis indukálása történik. Annak ellenére, hogy ennek a legfontosabb fázisnak a tanulmányozására számos laboratórium vállalkozott, még

1. táblázat. Baktériumos foltbetegségek kialakulása

Ellenálló növényben (HR)		Fogékony növényben	
Inokuláció 0. óra Indukciós idő 2–4. óra	Növény- és baktériumsejt kontaktusa, kölcsönös felismerés ↓	Inokuláció 0. óra	A bakt. szaporodásnak indul. A növényi cukrokból termelt bakteriális EPS-burok meggátolja a növény és baktériumsejt közötti kontaktust, vagyis a kölcsönös felismerést.
Latencia idő 3–6. óra	A membránok permeabilitásának emelkedése ↓	Zsírfooltok megjelenése 3–6. nap	A szaporodó baktériumok termeltek EPS a vizet a sejtközötti járatokban adszorbeálja, ami biztosítja a baktériumok tömeges szaporodását.

Növényi sejt kollap-
szusa 6–12. óra

Vakuolum anyagai a ci-
toplazmába ömlenek



Citolitikus anyagok fel-
gyülemzése

Bakteriosztázis 24.
óra

Növényi sejt elhalása

A kórokozó és a betegség lokalizálódik.

A zsírfoltokban szaporodó bakté-
riumok az oldott cukrokat nagy-
részen felhasználják és ezért az
új baktériumsejteken az EPS-
burok már nem alakulhat ki.

Zsírfoltok nekrotizá-
lódása 5–10. nap

A burok nélküli baktériumsejtek
indukálják a növényi sejtelhalást
(lásd a folyamatot a rezisztens nö-
vényben).

Foltok körüli sárgu-
lás 6–12. nap

A pusztuló baktériumsejtekből to-
xinok szabadulnak fel.

Foltok közötti szö-
vetek pusztulása
10–20. nap

A lokálisan nekrotizálódó szöve-
tekben ammónia és etilén szaba-
dul fel, ami a környező szövetek
elhalását eredményezi.

A betegségzindróma kialakul.

ma sem ismerjük pontosan sem a felismerés, sem az indukció minden részletét. Mindkét aktushoz a baktériumsejttel és a növényi sejttel közvetlen érintkezése, kontaktusa alapvetően szükséges, ami azzal is bizonyítható, hogy ha a baktériumsejteket híg agar-agarba burkolják és így injekciózzák a szövetbe, akkor a HR nem alakul ki (Stall és Cook, 1979). Egyes kutatócsoportok erősen feltételezik, hogy a felismerésben a növényi sejttel lektinszerű anyagai (mint receptorhelyek) közvetlen kontaktusba lépnek a baktérium külső membránjának lipopoliszacharidjával (LPS), azonban ezt egyértelmű kísérletekkel még nem sikerült bizonyítani (Érsek et al., 1985). Laboratóriummunkban azonban kísérletileg bizonyítottuk, hogy csak az élő és metabolitikusan aktív baktériumsejtek képesek az indukcióra (Durbin és Klement, 1977). Baktérium-proteinszintézis gátlása is a HR elmaradását eredményezte (Sasser, 1982). Az indukció rendkívül finom mechanizmusára jellemző, hogy már egy baktériumsejt is elegendő egy 50 000-szer nagyobb növénysejtben a nekrotikus folyamat megindításához, azonban sem az indukció mibenlétét, sem az indukció utáni biokémiai történéseket a növénysejtben részletesen nem ismerjük.

Az indukció utáni latenciaidőben a fertőzött növény külsőleg tünetmentes marad. Ebben a 4-6 órát igénylő periódusban baktériumsejtre már tovább nincs szükség, mert az egyszer már indukált folyamat a növénysejtben

visszafordíthatatlan (Klement és Goodman, 1967). Nevezetesen, ha a baktériumsejteket a növényi szövetben az indukció után antibiotikumokkal gátoljuk vagy megöljük, a HR akkor is kifejlődik. Következésképpen, ha a „kontrolláló faktorok” egyszer már aktiválódtak a növénysejtben, akkor a HR kifejlődik élő baktériumsejt jelenléte nélkül is. Ennek az autolitikus folyamatnak biokémiai és fiziológiai természetéről csak keveset tudunk, de néhány folyamat már ismert. Így a légzésintenzitás jellemző emelkedése figyelhető meg (Németh és Klement, 1967). Hasonlóan, néhány enzim aktivitását tapasztalhatjuk a latens periódus alatt (ribonukleáz, G-6P-dehidrogenáz, 6-P-G-dehidrogenáz és sikimát-dehidrogenáz). Ugyanakkor más enzimek szintje (peptidáz, polifenoloxidáz, peroxidáz, fenilalanin-ammonia-liáz és citokrómoxidáz) változatlan maradt (Németh, Klement és Farkas, 1969). A legjellemzőbb és legfontosabb változás a növényi sejtmembránok fokozott permeabilitása, ami elkezdődik ennek a periódusnak a végén, és a sejt kollapszus alatt éri el a csúcst. Ez egyben a HR kifejlődésének legdrámaibb időszaka, amikor a gyors biokémiai és fiziológiai változások eredménye láthatóvá válik és a szövet 1-2 óra alatt elpusztul. A fertőzött szövet elveszti turgorát és kollabál. Ha az inokulumkoncentráció kevesebb volt annál, hogy minden növénysejt találkozzék legalább egy baktériummal (10^7 sejt ml^{-1}), akkor a sejt elhalást

csak mikroszkopikusan lehet látni (Turner és Novacky, 1974).

A növénysejtek, ill. a hiperszenzitív szövet gyors kollapszusát azzal magyarázzuk, hogy a membránok permeabilitásának növekedése, majd pusztulása miatt a vakuolum tartalma a citoplazmába ömlik. Ismert, hogy a vakuolum a fenolok raktározási helye, amelyek rendszerint glikozid derivátumok formájában vannak jelen. Lehetséges, hogy az autolízis során az aktiválódó hidrolitikus enzimek kapcsolatba lépnek fenolszerű glikozidokkal, valamint szabad fenolokkal és így sejtmérgeket, citolitikus anyagokat formálnak. Ezek a fenolszerű vegyületek és oxidációs produktumaik (fitoalexinek) mérgező hatásúak mind a növénysejtre, mind a baktériumsejtre. Talán ezzel magyarázható, hogy a sejtkollapszus után a baktériumsejtszám is csökken a hiperszenzitív reakción átesett szövetben.

Intézetünkben Ádám és munkatársai a gazdasajt membránjainak lipidösszetétel-változásait vizsgálják a bakteriális hiperszenzitív nekrosis lefolyása alatt. Erősen feltételezik a szabad gyökök, pl. a szuperoxid anion felszabadulásának fontos szerepét a nekrosis kialakulásában.

A növényi sejtpusztulás alatt a fehérjebontás eredményeképpen ammónia akkumulálódik, ami szintén sejtméreg. Legutóbb a Darmstadti Egyetem Botanikai Intézetében Ullrich professzorral és munkatársaival mértük és fi-

gyeltük meg az ammónia erőteljes emelkedését a hiperszenzitív nekrózis alatt, amely mint sejtméreg szintén szerepet játszhat mind a szövet-nekrózisban, mind a bakteriosztázisban.

Összefoglalva a hiperszenzitív reakció jelentőségét a növényi rezisztenciában, úgy tűnik, hogy a rezisztens növény néhány sejtjének „feláldozásával” lokalizálja a számára idegen inkompatibilis kórokozót. Ebben az értelemben a hiperszenzitív reakció nemcsak a nekrózis kialakulását, hanem az idegen kórokozó felismerését és a nekrózis indukálását is magában foglalja.

Mivel a fitopatogén baktériumoknak HR indukáló képessége rendkívül gyors, módszerünkkel lehetővé vált a korábban több hónapot igénybe vevő patológiai teszt lerövidítése 8-10 órára (Klement, 1963). Ez a patológiai teszt szintén bevonult a nemzetközi gyakorlatba.

A BETEGSÉG LEFOLYÁSA A FOGÉKONY NÖVÉNYBEN

Ahhoz, hogy megértsük a növény baktériumokkal szembeni védekezési lehetőségeit, feltétlenül ismernünk kell a fogékony növényben, az ún. kompatibilis kapcsolatban végbemenő folyamatokat is. Nézzük meg ezért a bab baktériumos levélfoltosság-modelljén keresztül a baktériumfertőzés lefolyását fogékony gazdában (1. táblázat).

A televízióban vagy a filmvásznon nap mint nap tapasztalhatjuk, hogy sokszor egy közömbös, semmitmondó tájnak kinagyított részletei milyen csodálatos világot tárnak fel. Próbáljunk mi is egy általános levélfoltosodás-tüneteket mutató növényből kiindulva annak részleteit feltárni, egyre közelebb menve a betegség kialakulásának alapjaihoz és okaihoz. Ha közelebbről megnézünk egy fertőzött levelet, csakhamar feltűnik, hogy a levéllelhalás képe nem egységes, hanem megkülönböztethetünk lokális foltokat, foltok körüli klorotikus elszíneződéseket és a lokális foltok közötti szövetrészek elhalását. Ha ugyanezt a képet a betegség kialakulásának folyamatában vizsgáljuk, azt tapasztaljuk, hogy a fertőzés utáni 5-6. napon először ún. zsírfoltok alakulnak ki, ami a fertőzött szövet sejtközütti járatainak vízzel való telítődésének külső megjelenési formája. Ezek a zsírfoltok újabb 5-6 nap múlva megbarnulnak, elhalnak, és gyakran a foltokat kloro-

tikus udvar szegélyezi (udvaros foltosság). A betegség későbbi stádiumában a foltok közötti egészséges szövetek is fokozatosan elhalnak, nekrotizálódnak, és így a végső betegségrázó kialakul. Próbáljuk ennek a betegségrázóknak egyes fázisait nyomon követni.

A fertőzést követő első tünet, mint említettem, a zsírfoltok megjelenése. Mivel a zsírfoltképzés a patogenezis első állomása, érdemes ezt a kérdést alaposabban szemügyre venni. Az jól ismert, hogy a baktériumok a levél nyitott légzőnyílásain keresztül passzív úton jutnak a sejtközötti járatokba. A sejtközötti járatok biztosítják a légcserét, azonban a sejtek felületét a kiszáradástól egy folyadékhártya védi. Egy egyszerű technikai fogással sikerült kinyernünk ezt az intercelluláris folyadékot, amiről bebizonyosodott, hogy bőven tartalmaz olyan tápanyagokat, amelyben a növénykórokozó baktériumok kezdeti szaporodása biztosított. Ez a növényi sejt felületén lévő folyadékhártya talán elég a kórokozó kezdeti szaporodásához, de a tömeges felszaporodásához már nem elegendő. Igen érdekes az a tény, hogy a növénykórokozó baktériumok és csakis a kórokozók (szaprofitonok nem) maguk gondoskodnak arról, hogy megfelelő miliőt biztosítsanak saját maguk tömeges szaporodásához. Ennek a miliőnek a kialakulását a baktérium-nyálkaburok biztosítja. Ugyanis a baktériumsejtet körülvevő nyálkaanyag extracelluláris poliszacharidokat (EPS) tartalmaz, ami

fizikai hatásánál fogva a környezetből a vizet megköti, adszorbeálja. Ennek következtében a sejtközi járatok vízzel telítődnek (zsírfoltosodás), alkalmassá téve azokat a tömeges baktériumszaporodásra. A fertőzött szövet a vizet részben a levél felületén lévő harmatcseppből, vagy a környező sejtekből vonja el. Ezzel magyarázható az, hogy csapadékos, párás időben a baktériumos levélfoltok száma hirtelen megnő.

A Göttingeni Egyetem munkatársaival együttműködve célunk volt a patogenezis első lépésének alaposabb tanulmányozása, a kérdést részben a baktérium, részben a növény oldaláról vizsgálva. Modellkísérletünkben a babkórokozó *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (később *P. phaseolicola*) baktériumot használtuk. A baktérium-nyálkaanyag képződés már negatív festéssel fénymikroszkóp alatt is jól látható, azonban az elektronmikroszkópos felvételek több részletet is feltárnak. Ezen a felvételeken már jól látható a burokanyag elkülönülése az amorf nyálkaanyagtól. A nyálkaanyag kémiai analízise azt bizonyította, hogy a zsírfoltosodásért egy poliszacharid, az alginát felelős. Ezt a baktérium elsősorban glükózból termeli. A legutóbbi vizsgálatok szerint a *P. phaseolicola* sejtjét két fő komponensből álló burokanyag veszi körül; egy belső kapszula, aminek a fő komponense, a külső sejtfolat alkotó lipopoliszacharidon kívül, a leván és a külső amorf nyálkaréteg, ami első-

sorban a zsírfoltképzésért felelős alginátot tartalmazza.

A göttingeni kísérleteink alapján csakhamar kitűnt, hogy a nyálkaanyag képzésének a patogenezisben egy másik fontos szerep is jut. Megfigyelhető ugyanis, hogy a zsírfoltosodást követően a zsírfoltok közepéből nekrotizálódás indul meg, ami lassan az egész zsírfoltra kiterjed. Ez a szövetelhalás a második állomása a betegségrszindróma kialakulásának. A kérdés az volt, hogyan jön létre a nekrózis, vagyis a növénysejtek elhalása, hiszen a zsírfoltosodás alatt a növénysejtek még élnek és funkcióképesek. A kérdés megoldására az ötletet tulajdonképpen az a megfigyelés adta, hogy a nekrózis mindig a zsírfoltosodás közepéből indul ki, ahol a baktériumszám a legmagasabb. Mivel előző kísérletek bizonyították, hogy az algináttermelés csak cukor jelenlétében lehetséges, feltételeztük azt, hogy a foltok közepén a nagyszámú baktériumsejt már felhasználta a cukor nagy részét, és így az ezeken a helyeken szaporodó baktériumok új egyedei nem jutván elég glükózhoz, alginátburkot nem termelnek. Az ilyen „csupasz” sejtek sejt—sejt kontaktusba kerülnek a növénysejttel és így, a hiperszenzitív nekrozishoz hasonlóan, a fogékony növényben is nekrozist indukálnak. Feltevésünk tisztázása érdekében a növényeket néhány napra sötétbe helyeztük azért, hogy a sötétben a cukorszint csökkenjen. Két napra sötétbe helyezett babnövény trifóliumaiban a cukor-

szint, pl. glükóz és szacharóz, a természetes fényciklusban tartott levelekhez viszonyítva 4-6%-ára csökkent. A fertőzést követően a sötétbe visszahelyezett növényeken a zsírfoltosodás teljesen elmaradt és helyette csak szövet-nekrózis alakult ki, viszont a kontroll (világosban maradt) növényeken a zsírfoltok a 3. napra megjelentek. Ezt a kísérletet több levélfoltosodás betegségénél is megismélteltük (gyapot — *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*; uborka — *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*) és minden esetben azt tapasztaltuk, hogy csak zsírfoltosodás nélküli nekrosis jelentkezett. Ha ilyen növényeket újra világosba vittünk, akkor a nekrosis körül gyenge zsírfoltosodás alakult ki.

Megvizsgáltuk a baktériumok szaporodásmenetét a sötétben és világosban tartott babnövények trifóliumaiban. Azt tapasztaltuk, hogy a baktériumok mindkét növényben egyforma gyorsan szaporodtak a fertőzést követő két napig. Azonban, a sötétben lévő növényeknél, amikor a nekrosis kezdeti tünete megjelent, a baktériumszaporodás megtorpant, és amikor már a teljes nekrosis kialakult, az élő baktériumszám is drasztikusan lecsökkent. A világosban maradt kontroll növényekben viszont a zsírfoltosodás miatt a baktériumszaporodás nem állt meg, hanem még 10-100-szorosára tovább emelkedett és erőteljes baktériumsejt-károsodás a kísérlet 7. napjáig nem következett be.

Ezek a kísérletek nagymértékben alátámasztották feltételezésünk helyességét. Vagyis azt, hogy a zsírfoltban jelentősen felszaporodó baktériumsejtek szaporodásuk közben felhasználják az intercellulárisokban lévő cukrot, így a később létrejövő új baktériumsejtek alginátot már nem tudnak termelni. Ezt sötétben és világosan tartott, fertőzött növényekből vett minták algináttartalmának összehasonlítása is bizonyította. Ilyen, baktérium-nyálkaburok nélküli baktériumsejtek sejtfala közvetlen érintkezésbe kerül a növénysejtfallal, és így a nekrosis indukálása akadálytalan (Klement, Gross és Rudolph, 1985).

Más kísérletekben már bizonyítottuk, hogy a zsírfoltosodást követő nekrosis kialakulásának négy fázisa: az indukciós idő; a latenciaperiódus és a sejtkollapszus; továbbá a baktérium pusztulása fogékony növényben is ugyanúgy megállapítható, mint a rezisztens növényben lejátszódó hiperszenzitív nekrosis esetében. Mindkét nekrosis lefolyásának sebessége közel azonos, és az indukciós idő hossza is mindkét esetben azonos. Különbség az indukcióhoz szükséges baktérium sejtszámában mutatkozik. Ugyanis rezisztens kapcsolatban a nekrozist már egy baktériumsejt is képes indukálni, és így a betegség már a fertőzés kezdeti szakaszában lokalizálódik. Fogékony növényben viszont a nekrosis indukálásához növénysejtenként legalább száz baktériumsejtre van szükség. Ilyen nagymértékű szaporodást a kez-

deti szakaszban létrejött zsírfoltosodás, vagyis a sejtközütti járatok vízzel telítődése biztosítja. Az elmondottakból világosan kitűnik, hogy a baktérium nyálkaképződésének két fontos patológiai szerepe van: egyrészt lehetővé teszi a baktérium nagymértékű szaporodását, másrészt meggátolja a fertőzés kezdeti szakaszában a nekrosis indukálását, így a kórokozó lokalizálását.

Néhány növénykórokozó baktérium még további patogenitásért felelős faktorról is rendelkezik. Itt elsősorban kell megemlítenem néhány baktériumtoxint (tabtoxin, phaseolotoxin, coronatin és a syringomycin). Ezek a kis-molekulasúlyú vegyületek a fertőzés körüli szövetekbe diffundálnak, és a kloroplasztiszokat degenerálják. Így jön létre a következő szimptóma, az udvaros foltosság. Ezeknek a toxinoknak a betegség-szindróma kialakításában csak másodlagos szerepük van, de a kórokozó virulenciáját befolyásolják.

Nem ismerjük pontosan a kórfolyamat utolsó fázisában szerepet játszó másodlagos nekrosisok kialakulásának biokémiai mechanizmusát. Ezek a másodlagos nekrosisok a zsírfoltok helyén létrejött elsődleges nekrotikus foltok közötti területeken alakulnak ki. Ezért feltételezhető, hogy az elsődlegesen nekrotizálódó szövetekben felhalmozódott ammónia toxikus hatásának következményei.

Összefoglalva láthatjuk, hogy a fogékony növényben a levélfoltosodás szindrómájának

kialakításában a kórokozó különböző patológiai faktorai játszanak szerepet. Azonban, hogy milyen molekuláris folyamatok játszódnak le a fertőzés kezdeti szakaszában, amelyek eldöntik, hogy a növény a kórokozóval szemben szenzitív vagy rezisztens választ adjon, még nem ismerjük.

Ezt a kérdést megközelítendő, az utóbbi években az SZBK Genetikai Intézetének munkatársaival együttműködve olyan baktérium-mutánsokat igyekeztünk előállítani, amelyek a patológiai folyamatokra nézve defektívek, hibásak. Ehhez a genetikai munkához a transzpozon mutagenézist használtuk.

Ennek során az *Escherichia coli* SM 10 törzset alkalmaztuk, melyet pSUP1011 plazmiddal transzformáltak. Ennek a plazmidnak része a Tn5 transzpozon. Mikor együtt növesztettük az *Escherichia coli*-t az általunk mutagenizálni kívánt *Pseudomonas phaseolicolá*val, az igen gyakori konjugáció során a plazmid képes volt átjutni a *P. phaseolicolá*ba, ahol azonban nem tudott fennmaradni. Ekkor a Tn5 „kiugrott” a plazmidból és a baktérium kromoszómájába integrálódott, ahol ezáltal indukált egy mutációt. Miután bizonyítottuk, hogy a Tn5 azonos valószínűséggel integrálódott a kromoszóma különböző pontjaira, 3700 független mutánst teszteltünk le inkompatibilis növényen, keresve azokat a mutánsokat, amelyek nem képesek HR-t indukálni. Hasonló módon teszteltük a mutánsok kórtünet indukáló ké-

pességét is a kompatibilis gazdanövényen. A kísérletek során 6 olyan mutánst sikerült izolálnunk, melyek teljesen vagy részben defektívnek bizonyultak a fenti kórfolyamatokban. Ezek a HR-indukcióra vagy zsírfoltosodás előidézésére képtelen mutánsok remélhetőleg alkalmasak lesznek arra, hogy a patogenitás molekuláris alapjainak vizsgálatát megkezdjük (Somlyai et al., 1986).

Kedves hallgatóim, engedjék meg, hogy a baktérium—gazdanövény kapcsolat bonyolultságát egy másik példán keresztül is bemutassam. A jelenlevők közül sokan ismerik a *kajszí-gutaütés betegséget*, amit másfél évtizeddel ezelőtt még élettani betegségnek véltek. A köznyelv nagyon találóan gutaütésnek (apoplexiának) nevezi a kórképet, mert hiszen az előzőleg viruló kajszifák hirtelen, szinte napok alatt elpusztulnak. Ez a betegség is hozzájárult a nagyüzemi kajszitermesztésünk kudarcához.

Nagyrészt intézetünk kutatóinak sikerült bizonyítani, hogy a gutaütés nem élettani, hanem fertőzőes betegség, amiért egyrészt egy baktérium, a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (lásd később *Pseudomonas syringae*), másrészt a *Cytospora cincta* gomba felelős. Itt kell megemlítenem Rozsnyay Zsuzsa és Vajna László munkásságát, akik elsősorban a gombák által okozott rákosodásnak tanulmányozásában úttörő munkát végeztek.

Előadásomban csak a baktériumos kajszi-gutaütéssel kapcsolatos érdekesebb eredményekről számolok be.

Ezek a vizsgálatok egyben érdekesen szemléltetik, hogyan jut el egy növénykórtani alap-kutatás olyan távol álló gyakorlati eredményekhez, mint pl. a mesterséges hógyártás olyan területeken, ahol kevés a síelésre alkalmas hó, vagy akár egy új fagylaltgyártási technológiához.

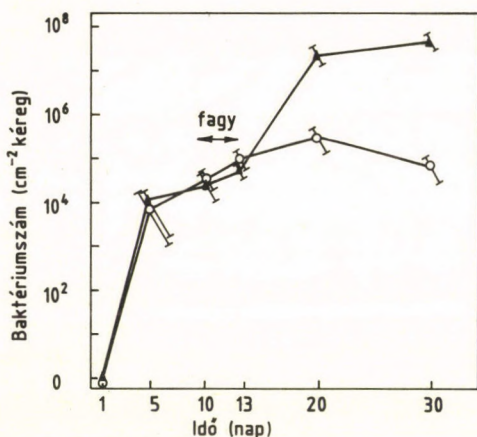
Kétségtelen, hogy az eredményes kutatáshoz szerencse is kell. Mi is szerencsések voltunk, amikor a kórokozó első izolálását véletlenül a tavaszi hónapokban kezdtük. Ugyanis — amint az a későbbi vizsgálatainkból kitűnt — a kórokozó *Pseudomonas syringae* baktériumot csak a tavaszi hónapokban lehet izolálni. Ez is egyik oka lehetett annak, hogy a betegség etiológiájának kiderítése oly soká váratott magára. A másik ok az lehetett, hogy a beteg szövetben a nagyszámú kísérő baktériumflóra közül a patogént kiválasztani nagy nehézséget jelent. Ahhoz, hogy a mesterséges fertőzéseket elvégezhessük, egyrészt üvegházban kajszioltványoknak kellett volna rendelkezésre állni, másrészt már előre ismernünk kellett volna azt az időszakot, amikor a fák fertőzhetők. Ezt a szinte kilátástalannak tűnő munkát egyszerűsítettük le a korábban elmondott hiperszenzitiv reakció módszerének alkalmazásával (Klement, 1963). A számos ismeretlen baktériumizolátumot először dohánylevélbe injekcióztuk.

szint, pl. glükóz és szacharóz, a természetes fényciklusban tartott levelekhez viszonyítva 4-6%-ára csökkent. A fertőzést követően a sötétbe visszahelyezett növényeken a zsírfoltosodás teljesen elmaradt és helyette csak szövet-nekrózis alakult ki, viszont a kontroll (világosban maradt) növényeken a zsírfoltok a 3. napra megjelentek. Ezt a kísérletet több levélfoltosodás betegségnél is megismélteltük (gyapot — *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*; uborka — *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*) és minden esetben azt tapasztaltuk, hogy csak zsírfoltosodás nélküli nekrosis jelentkezett. Ha ilyen növényeket újra világosba vittünk, akkor a nekrosis körül gyenge zsírfoltosodás alakult ki.

Megvizsgáltuk a baktériumok szaporodásmenetét a sötétben és világosban tartott babnövények trifóliumaiban. Azt tapasztaltuk, hogy a baktériumok mindkét növényben egyforma gyorsan szaporodtak a fertőzést követő két napig. Azonban, a sötétben lévő növényeknél, amikor a nekrosis kezdeti tünete megjelent, a baktériumszaporodás megtorpant, és amikor már a teljes nekrosis kialakult, az élő baktériumszám is drasztikusan lecsökkent. A világosban maradt kontroll növényekben viszont a zsírfoltosodás miatt a baktériumszaporodás nem állt meg, hanem még 10-100-szorosára tovább emelkedett és erőteljes baktériumsejt-károsodás a kísérlet 7. napjáig nem következett be.

Ezek a kísérletek nagymértékben alátámasztották feltételezésünk helyességét. Vagyis azt, hogy a zsírfoltban jelentősen felszaporodó baktériumsejtek szaporodásuk közben felhasználják az intercellulárisokban lévő cukrot, így a később létrejövő új baktériumsejtek alginátot már nem tudnak termelni. Ezt sötétben és világosban tartott, fertőzött növényekből vett minták algináttartalmának összehasonlítása is bizonyította. Ilyen, baktérium-nyálkaburok nélküli baktériumsejtek sejtfala közvetlen érintkezésbe kerül a növénysejtfallal, és így a nekrosis indukálása akadálytalan (Klement, Gross és Rudolph, 1985).

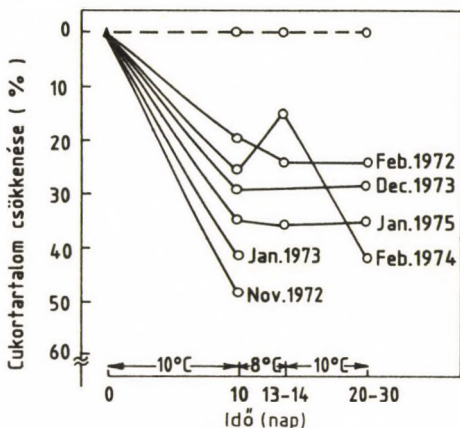
Más kísérletekben már bizonyítottuk, hogy a zsírfoltosodást követő nekrosis kialakulásának négy fázisa: az indukciós idő; a latenciaperiódus és a sejtkollapszus; továbbá a baktérium pusztulása fogékony növényben is ugyanúgy megállapítható, mint a rezisztens növényben lejátszódó hiperszenzitív nekrosis esetében. Mindkét nekrosis lefolyásának sebessége közel azonos, és az indukciós idő hossza is mindkét esetben azonos. Különbség az indukcióhoz szükséges baktérium sejtszámában mutatkozik. Ugyanis rezisztens kapcsolatban a nekrosist már egy baktériumsejt is képes indukálni, és így a betegség már a fertőzés kezdeti szakaszában lokalizálódik. Fogékony növényben viszont a nekrosis indukálásához növénysejtenként legalább száz baktériumsejtre van szükség. Ilyen nagymértékű szaporodást a kez-



1. ábra. A *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* baktérium sejtszám emelkedése a fertőzött kajsziifa kéregszövetében. Fagyhatástól mentes kéregszövetben (o-o); fertőzés után 10 nappal fagyhatásnak kitett kéregszövetben (▲-▲)

fertőzött ágat csak -5°C -nak teszünk ki, akkor a kéreg elpusztul, nekrotizálódik. Fertőzés nélkül a kontroll ágak még -25°C -t is elviselnek.

Tamássy István akadémikus és egyiptomi aspiránsa, M. Zayan szoros összefüggést talált a kajszi fák összecukortartalma és a fagyérzékenysége között. A fagyrezisztens fajták cukortartalma jellemzően magasabb volt. Kézenfekvő volt tehát az a feltételezésünk, hogy a baktériumok szaporodásuk közben a cukrokat felhasználják és így a kéreg cukortartalma lecsökken. A kéreg alacsony cukortartalma fagyérzékennyé teszi a kajszi fát. A Balaton-



2. ábra. Cukorszint csökkenése a nem fertőzött (o---o) és fertőzött (o—o) kajszifa kérgében

boglári Állami Gazdaság Laboratóriumával közösen végzett, négy évig tartó vizsgálatunk ezt a feltételezésünket nagymértékben támogatta, mert a baktériumfertőzött kajsziágakban a cukorszint a nem fertőzött ágakhoz viszonyítva 19-48%-kal csökkent (2. ábra) (Klement et al., 1984).

Hazai vizsgálatainkkal egy időben Madisonban amerikai kutatók egy csoportja azt vizsgálta, hogyan lehetséges az, hogy egy késői tavaszi fagy alkalmával egyes kukoricatövek megfagynak, mások nem. Céljuk az volt, hogy fagyrezisztens egyedeket szelektáljanak nemesítési célokra. Ez a próbálkozásuk azonban eredménytelen maradt. Minden olyan kísérle-

tük, amely a fagyérzékeny és ellenálló egyedek között bármiféle morfológiai vagy fiziológiai különbséget mutatott volna ki, szintén eredménytelen maradt. Végül, mikor a levelek felületén lévő mikroflórát vizsgálták, meglepetve tapasztalták, hogy ha egy bizonyos baktériumfaj jelen van, akkor a kukoricatövek már -1 , -2 °C-nál megfagynak, viszont amelyeken ez a baktérium nincsen, azok mínusz $4-5$ °C-ot is károsodás nélkül elviselnek. A baktérium azonosításakor kiderült, hogy ez a rejtélyes baktérium azonos a *Pseudomonas syringae*-vel, ami a kajszifák gutaütéses pusztulásáért is felelős. Ezért a kajszifáról izolált hazai törzseinket próbaképpen dohány- és babnövényekre permeteztük és valóban azt tapasztaltuk, hogy ezek a növények mínusz $1-2$ foknál megfagynak, míg a kontroll, csak vízzel permetezették ilyen hőmérsékleten nem károsodtak. Későbbi amerikai vizsgálatok megállapították, hogy ez a baktérium egy érdekes, ún. jégmagképző tulajdonsággal rendelkezik. Ez a tulajdonság könnyen demonstrálható azzal, hogy ha egy -5 fokos túlhűtött tiszta vízbe egy-két cseppnyi *Pseudomonas syringae* szuszpenziót csepeztünk, a víz hirtelen, szinte robbanásszerűen megfagy. Ma már tudjuk, hogy a *Pseudomonas syringae* egyik génje olyan fehérjét kódol, amely a jégmagképződésért felelős.

E felfedezés széles körű kutatómunkát indított meg világszerte, és ma már ott tartanak, hogy ezt a baktériumot tartják felelősnek az

atmoszferikus jégristályképződésért. Ezeknek a kutatásoknak gyakorlati eredménye az is, hogy hómentes helyeken a síelésre alkalmas havat ilyen jégmagképző baktériumok segítségével állítják elő. Ennek a baktériumnak bizonyos mutánsait a hűtőipar, sőt a fagylaltgyártás is hasznosítja.

Széles körű nemzetközi kutatások azt bizonyították, hogy a *Pseudomonas syringae* erősen polifág és elterjedt baktérium, ami növényeinken és gyümölcsöseinkben szinte állandóan, epifiton módon jelen van. Ennek a széles körű elterjedtségnek köszönhető részben a tavaszi fagy kártétele gyümölcsöseinkben. Ugyanis a virágokon mindig jelenlevő jégmagképző baktériumok tavasszal már gyenge fagyok (-1 , -2 °C) alkalmával is súlyos károkat okoznak.

Visszatérve a kajszi-gutaütés problémakörére, kétségtelen, hogy a fagyhatás előidézésében a kórokozó jégmagképző tulajdonsága is szerepet játszik, de, amint azt a legutóbbi vizsgálataink bizonyították, ez a szerepük másodlagos.

Ugyanis az SZBK Biokémiai Intézet igazgatóhelyettesének, Farkas Tibornak jelentős közreműködésével igazoltuk, hogy ez a kórokozó a kajszi-gutaütés szindrómájának előidézésében még egy eddig ismeretlen patogenitási faktorral is rendelkezik. Megállapítottuk, hogy a baktérium a kéregszövetben szaporodva, jelenleg ismeretlen módon, a sejtmembrá-

nok fagyérzékenységet jelentősen megnöveli. A kísérletek szerint a már hideg ellen edzett kajszifa kéregszövetében a fertőzés hatására a membránok foszfolipid-összetétele megváltozik. A foszfatidil-etanolamin-tartalom megnő és a foszfatidilkolin-tartalom jelentősen csökken. Ez a foszfolipid-változás a hideg edzéssel ellentétes folyamatra utal. Más szóval a fertőzött kéreg úgy viselkedik, mint egy edzetlen kéreg, vagyis rendkívül fagyérzékenynyé válik.

Azért, hogy jobban megértsük a kórokozónak ezt az új, érdekes patológiai szerepét, talán nem felesleges a sejt fagyhalálának lefolyását röviden szemléltetni. Az egészséges plazmamembránban a foszfolipidek két sorban lamellárisan helyezkednek el. Hideghatás következtében ez a szerkezet némely helyen megbomlik és itt foszfolipidek fejcsoportjai hexagonálisan helyezkednek el, vagyis a membránon pórusok keletkeznek. Edzett szövet a lamelláris állapotot hideghatásra is megtartja, így a sejtköztí folyadékban keletkezett jégkristályok a sejtbe nem tudnak „benőni” és roncsoló hatásukat elvégezni. Nem edzett szövetben a hexagonálisan elhelyezkedő foszfolipidek rést nyitnak a membránon, és így a jégkristályok a sejtköztí téréből a sejtbe nőnek és a citoplazmát szét-roncsolják. Mivel a *Pseudomonas syringae* vizsgálataink alapján képes az edzési folyamatot megfordítani, a fertőzött szövet erősen fagyérzékeny lesz.

Mindezek ismeretében most már érthetőbbé válik a kajszi-gutaütés teljes kórfolyamata:

1. A *Pseudomonas syringae* képes a csonthéjas gyümölcsfák kéregszövetében (beleértve a kambiumot is) felszaporodni.

2. Szaporodásuk közben a cukrokat hasznosítják, így az intercelluláris folyadék fagyáspontcsökkenése miatt a jégkristályok keletkezése már gyengébb téli fagyok alkalmával megindulhat.

3. A fertőzött szövetben felszaporodó nagyszámú baktérium a jégkristályképzést elősegíti és meggyorsítja.

4. Az eddig ismeretlen baktériummetabolit hatására a növénysejtek membránjainak architektúrája úgy változik, hogy a jégkristályok a sejtközötti térből a sejtbe nőnek és ott roncsoló hatásukat kifejteni.

Ezek az eredmények egyben azt bizonyítják, hogy nem a téli hideg predisponálja a szöveteket a baktériumtámadásra, hanem fordítva: a baktérium teszi érzékennyé a kéregszövetet a fagykárosításra.

Mint azt a bevezetőmben említettem, a betegség-szenzitivitás és -rezisztencia három esetét tárgyaltam kutatásaink tükrében. Ez a tudományág valóban nagy léptekkel haladt előre az elmúlt két évtizedben, azonban mégis számos olyan fehér folt maradt, aminek eltüntetése még várat magára. Így még mindig nem ismerjük pontosan a patogenezis alatti első lépéseket, pl. a kórokozó és növény kölcsönös

felismerését. Valószínű, hogy ilyen kérdésekre feleletet már csak genetikai és molekuláris biológiai módszerekkel kaphatunk. Ezért az új kutatógeneráció feladata lesz ezeket az izgalmas kérdéseket molekuláris szinten jobban megközelíteni.

IRODALOM

- DURBIN, R. D., KLEMENT, Z. (1977): High-temperature repression of plant hypersensitivity to bacteria: A proposed explanation. In: Király, Z. (ed.), *Current Topics in Plant Pathology*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 239—242.
- ÉRSEK, T., GÁBORJÁNI, R., HÖLTZL, P., KIRÁLY, Z. (1985): Sugar-specific attachment of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* to isolated single leaf cells of resistant soybean cultivars. *Phytopathol. Z.* **113**, 260—270.
- KLEMENT, Z. (1963): Rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic pseudomonads. *Nature* **199**, 299—300.
- KLEMENT, Z. (1971): The hypersensitive reaction of plants to bacterial infections. *Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.* **6**, 115—118.
- KLEMENT, Z. (1982): Hypersensitivity. In: Mount, M. S. & Lacy, G. H. (eds.), *Phytopathogenic Prokaryotes*. Academic Press **2**, 149—177.
- KLEMENT, Z., FARKAS, G. L., LOVREKOVICH, L. (1964): Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopathology* **54**, 474—477.
- KLEMENT, Z., GOODMAN, R. N. (1967): The hypersensitive reaction to infection by bacterial plant pathogens. *Ann. Rev. of Phytopathol.* **5**, 17—44.
- KLEMENT, Z., GROSS, M., RUDOLPH, K. (1985): Leaf necrosis instead of water-soaking due to light deficiency after inoculation with Pseudomonads and Xanthomonads. In: Civerolo et al. *Plant Pathogenic Bacteria*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 530—536.
- KLEMENT, Z., ROZSNYAY, D. S., ARSENIJEVIC, H. M. (1974): Apoplexy of apricots. II. Relationship of winter-frost and the bacterial canker and dieback of apricots. *Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.* **9**, 35—45.
- KLEMENT, Z., ROZSNYAY, D. S., BÁLÓ, E., PÁNCZÉL, M., PRILESZKY, GY. (1984): The effect of cold on development of bacterial canker in apricot trees infected with *Pseudo-*

monas syringae pv. *syringae*. *Physiol. Plant Pathol.* **24**, 237—246.

KLEMENT, Z., ROZSNYAY, D. S., VISNYOVSKY, E. (1972): Apoplexy of apricots. I. Bacterial dieback and development of the disease. *Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.* **7**, 3—12.

NÉMETH, J., KLEMENT, Z. (1967): Changes in respiration rate of tobacco leaves infected with bacteria in relation to hypersensitive reaction. *Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.* **2**, 303—308.

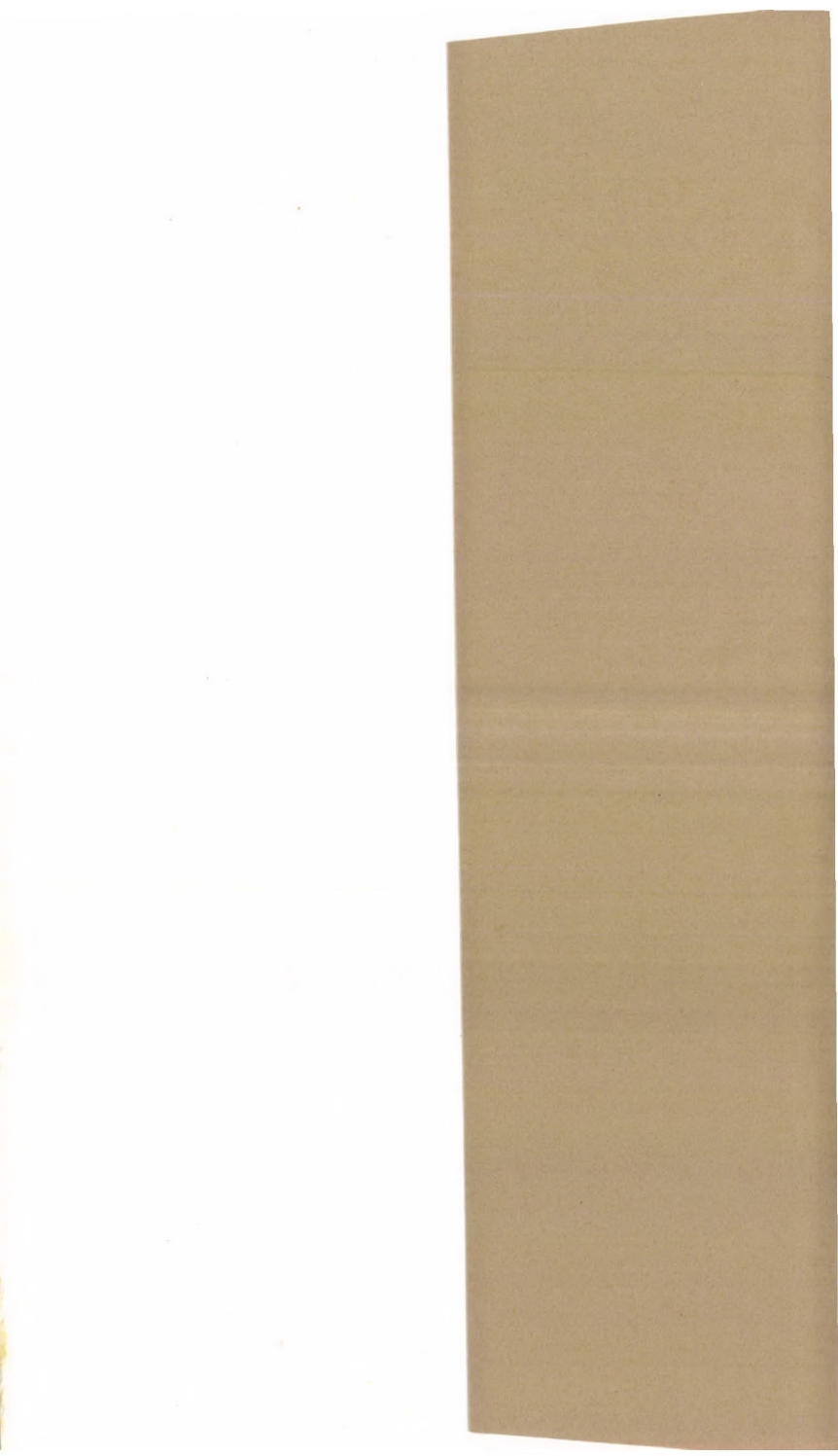
NÉMETH, J., KLEMENT, Z., FARKAS, G. L. (1969): An enzymological study of the hypersensitive reaction induced by *Pseudomonas syringae* in tobacco leaf tissue. *Phytopathol. Z.* **65**, 267—278.

SASSER, M. (1982): Inhibition by antibacterial compounds of the hypersensitive reaction induced by *Pseudomonas pisi*. *Phytopathology* **72**, 1513—1517.

SOMLYAI, G., HEVESI, M., BÁNFALVI, ZS., KLEMENT, Z., KONDOROSI, Á. (1986): Isolation and characterization of non-pathogenic and reduced virulence mutants of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* induced Tn5 transposon insertions. *Physiol. and Mol. Plant Pathol.* **29**, 369—380.

STALL, R. E., COOK, A. A. (1979): Evidence that bacterial contact with the plant cell is necessary for the hypersensitive reaction but not the susceptible reaction. *Physiol. Plant Pathol.* **14**, 77—84.

TURNER, J. G., NOVACKY, A. (1974): The quantitative relation between plant and bacterial cells involved in the hypersensitive reaction. *Phytopathology* **64**, 885—890.



Ára: 28,- Ft